

BEST AVAILABLE COPY

(19)  KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 100183448 B1
(43)Date of publication of application: 16.12.1998

(21)Application number: 1019960019281
(22)Date of filing: 31.05.1996

(71)Applicant: CHEIL JEDANG CORPORATION
LEE, SEUNG KI
PARK, MAN KI
(72)Inventor: HAN, SANG BEOM
KIM, JONG MUN
LEE, GWANG YEOL
LEE, SEUNG KI
PARK, JEONG IL
PARK, MAN KI

(51)Int. Cl. A61K 31 /575

(54) ANTICANCER DRUG COMPOSITION CONTAINING GINSENOSE Rg5

(57) Abstract:

PURPOSE: An anticancer drug composition containing ginsenoside Rg5 is provided, in which the ginsenoside Rg5 exist in a red ginseng only in a very small quantity(do not exist in common ginseng), and the ginsenoside Rg5 shows strong anticancer activity, especially to liver cancer cells.
CONSTITUTION: A process for the preparation of ginsenoside Rg5 comprises the steps of: putting ginsengs 100g into an airtight container, and heating at 130deg.C for 2hrs; extracting the ginseng with methanol 200ml to get methanol extract; evaporating methanol to eliminate, suspending the residue in water 100ml, and extracting with ether 100ml per 1time(repeating for 3times); extracting the residual solution layer with hydro-saturated butanol 100ml per 1time(repeating for 3times) to get saponin-contained butanol extract; drying the butanol extract, and processing silica gel column using a mixed solvent of ethylacetate/methanol/water(20:1:1) repeatedly to get a fraction about 500mg containing the objective ginsenoside Rg5 60%.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19960531)
Notification date of refusal decision ()
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (19980921)
Patent registration number (1001834480000)

Date of registration (19981216)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent ()

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)(51) Int. Cl. ⁶
A61K 31/575(45) 공고일자 1999년05월01일
(11) 공고번호 10-0183448
(24) 등록일자 1998년12월16일

(21) 출원번호	10-1996-0019281	(65) 공개번호	특1997-0073593
(22) 출원일자	1996년05월31일	(43) 공개일자	1997년12월10일
(73) 특허권자	제일제당주식회사 손경식 서울특별시 중구 남대문로 5가 500번지 박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310-1502 이승기 서울특별시 서초구 반포동 34-13 한신한강아파트5-803		
(72) 발명자	박만기 경기도 성남시 분당구 구미동 66 신원아파트 310동 1502호 이승기 서울특별시 서초구 반포동 34-13 한신한강아파트 5-803 박정일 서울특별시 강남구 일원본동 한솔마을아파트 301-208 김중문 서울특별시 송파구 잠실2동 주공아파트 229-313 이광열 대전광역시 동구 자양동 105-1 한상범 서울시 관악구 봉천4동 1577-24번지 202호		
(74) 대리인	김석중 최규팔		

심사관 : 김이용

(54) 진세노사이드 Rg5를 함유하는 항암제 조성물

요약

본 발명은 인삼의 성분중의 하나인 진세노사이드 Rg₅를 활성성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg

₅는 수삼, 백삼 등의 인삼식물에는 거의 존재하지 않고 홍삼중에 극미량으로만 존재하는 성분으로, 인삼식물을 110 내지 180℃의 고온에서 0.5 내지 20 시간 동안 가열함으로써 그 함량이 현저히 증가하는 성분으로서, 강력한 항암활성, 특히 간암세포에 대해 강력한 항암활성을 나타낸다.

명세서

[발명의 명칭]진세노사이드 Rg₅를 함유하는 항암제 조성물[도면의 간단한 설명]제1도는 실험에 4에 따라 간암세포주 sk-Hep-1에서 인삼사포닌 Rg₅가 cdk2, 사이클린(cyclin) A, 사이클린 E 및 cdc25A의 합성에 미치는 영향을 웨스턴-블롯 분석방법에 의해 측정된 결과를 나타낸 것이다.

제2도는 실험에 5에 따라 간암세포주 sk-Hep-1에서 인삼사포닌 Rg₅가 사이클린 E 의존적인 단백질 키나제(cyclin E-dependent protein kinase)인 cdk2의 합성에 미치는 영향을 면역복합체 키나제 분석방법에 의해 측정된 결과를 나타낸 것이다[A는 화학발광성을 측정된 X선 필름이고, B는 이 X선 필름의 화학발광도를 덴시토메터(densitometer: UC 630, Umax)와 이미지퀀트(ImageQuant) 프로그램(Molecular Dynamics)으로 정량해서 나타낸 것이다].

[발명의 상세한 설명]본 발명은 인삼의 유효성분중의 하나인 진세노사이드 Rg₅를 활성성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

인삼은 고래로부터 가장 대표적인 자양강장제로 널리 사용되어 오고 있으며, 최근에는 그 성분과 약효에 대한 많은 연구결과가 보고되고 있어 그 신비한 약효가 현대 과학적인 조명을 받고 있다. 현재까지 알려진 인삼의 약효로는 노화 억제, 항동맥경화 및 고지혈증 개선, 간기능 항진, 방사선 장애 방어, 면역증강, 항혈전, 뇌기능 항진, 항스트레스, 혈당강하, 혈압강하, 항암효과 등이 있다.

일반적으로 인삼은 재배하여 채취한 그대로의 수삼, 수삼을 상온에서 건조시킨 백삼 또는 수삼을 98 내지 100℃에서 가열처리하여 제조되는 홍삼의 형태로 이용되고 있다. 이들중에서 특히 홍삼은 백삼보다도 훨씬 약효가 강하여 매우 귀중한 약재로 취급되고 있는데, 최근들어 홍삼에 함유되어 있는 특이적인 미량성분에 관한 연구가 활발히 진행되어 이들 성분의 새로운 약효에 관심이 높아지고 있는데, 특히 이러한 미량성분은 홍삼을 가열하여 제조하는 과정에서 생성되는 것으로도 홍삼의 우수한 약효를 설명해줄 수 있는 성분으로 평가되고 있다.

인삼이 가지고 있는 여러 가지 약리학적 작용중에서 항암작용에 관한 연구는 비교적 최근에 와서야 이루어지고 있다. 인삼의 항암작용에 대한 연구결과와 하나로, 생쥐의 백혈병 임파모세포인 P388, 인체 결장암 및 직장암 세포인 HT-29 및 HRT-18을 대상으로하여 홍삼의 식유에테르 추출물과 클로로포름, 메탄올, 아세톤 추출물 등의 세포종식 억제효과를 측정한 결과 모든 분획이 항암효과가 있으나 특히 아세톤 분획이 가장 효과가 큰 것으로 보고되었다[참조: 고려인삼학회지, 제17권 3호, 196-202 (1993)]. 또한 B16 세포주를 마우스에 주입하여 종양을 유발시킨 쥐에게 홍삼을 투여하여 형태학적 및 면역학적 연구를 실행한 결과에 따르면, 홍삼의 항암작용은 T 림프구에 의한 매개성 면역반응과 자연살해세포의 활성화 증가에 의한 것으로 보고되었다[참조: 고려인삼학회지, 제18권 3호, 151-159(1994)]. 또한, 분화연구에 대표적인 모델인 F9 기형종(teratocarcinoma)을 이용하여 진세노사이드 Rh

¹ 이 라미닌(laminin) 생성, 피브리노렉틴(fibrinolectin) 생성 및 암유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하고, 형태학적 관찰을 행한 결과에 따라 진세노사이드 Rh₁은 F9 세포의 정상배아세포로의 분화를 유도하는 것으로 밝혀졌으며, 이와 같은 진세노사이드에 의한 분화유도는 스테로이드 호르몬과 유사한 분화 기전에 의해 일어나는 것으로 보고되었다[참조: 제6회 인삼 심포지엄, 129]. 또한 멜라닌 합성을 촉진시키는 작용에 의해 진세노사이드 Rh

¹ 과 Rh₂는 미분화된 암세포를 정상세포로 분화시키는 것으로 보고되었다[참조: Cancer research, 47, 3863 (1987)]. 이러한 연구 결과들로부터 인삼은 항암활성이 탁월하다는 것을 알 수 있다.

본 발명자들은 인삼의 성분과 약효에 관한 연구를 수행하여 왔으며, 특히 인삼의 가공방법과 그에 따른 생리활성 및 생리활성물질의 변화에 관하여 연구를 수행하여 왔다. 그 결과, 인삼을 고온에서 가열처리하여 수득되는 가공인삼으로부터 홍삼에는 거의 존재하지 않던 인삼사포닌 진세노사이드 Rg

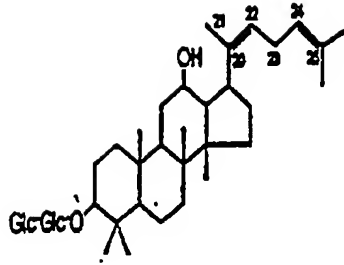
₅를 분리하고, 이 화합물이 탁월한 항암활성을 나타낸다는 것을 밝혀냄으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 즉, 본 발명에 따라 인삼을 110 내지 180℃의 고온에서 0.5 내지 20 시간 동안 가열한 후에 수득되는 가공인삼으로부터 진세노사이드 Rg

₅만을 선택적으로 분리, 수득하여 그의 약효를 확립시킴으로써 목적하는 효과 이외의 다른 부작용이 없이 인삼의 유효성분을 이용할 수 있게 된 것이다.

따라서 본 발명은 활성성분으로서 진세노사이드 Rg₅를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 분리하여 이용되는 진세노사이드 Rg₅는 수삼, 백삼, 홍삼 등의 기존의 인삼제품에는 거의 또는 전혀 존재하지 않으나 고온에서 가열처리하여 수득되는 가공인삼에는 상당량 존재하는 성분으로서 다음 구조식으로 표시되는 화합물이다[분자식: C₄₂H₇₀O₁₂, 분자량: 766].

[화학식1]



본 발명에 따라 이용되는 진세노사이드 Rg₅는 인삼 사포넌을 함유하는 파낙스속 식물, 예를들면 파낙스 진생 (Panax ginseng), 파낙스 노토진생 (Panax notoginseng), 파낙스 퀸퀘폴리움 (Panax quinquefolium), 파낙스 야포니쿠스 (Panax japonicus) 등의 뿌리 또는 이들 식물의 잎, 이들 식물의 조직배양물, 또는 이들의 물 또는 저급 알콜에 의한 추출물을 110 내지 180℃ 의 온도에서 0.5 내지 20 시간 동안 가열처리한 후에 수득된 가공인삼을 적절한 유기용매, 예를들면 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하고, 추출물을 비극성 유기용매, 예를들면 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후에 남은 수층을 부탄올과 같은 극성 유기용매로 추출하여 이 추출물을 칼럼 크로마토그래피시킴으로써 순수하게 분리할 수 있다. 이 방법에서는 인삼을 가열 처리하는 과정에서 인삼중에 존재하는 파낙사디올계 사포넌인 진세노사이드 Ra, Rb

1, Rb₂, Rc, Rd 의 20 번 탄소에 결합한 당이 떨어져 나가고 탈수반응이 일어나 목적하는 진세노사이드 Rg₅가 생성된다. 경우에 따라, 상기의 과정에서 가열처리하는 대신에 온화한 조건하에서, 예를들면 30 내지 100℃ 에서, 바람직하게는 70℃ 에서 가열처리하면서 산, 예를들면 염산, 질산, 과염소산 등과 같은 묽은 광산, 또는 아세트산, 타타르산, 옥살산 등과 같은 저급 유기산으로 산처리하여 수행하는 경우에도 동일한 결과를 얻을 수도 있다.

또한 상기의 과정에서 인삼 대신에 공지의 화합물인 진세노사이드 Ra, Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등의 성분 또는 이들의 분획을 직접 상기한 바와 같은 방법으로 가열하거나, 산가수분해하여도 동일한 결과를 얻을 수 있다.

본 발명에 따르는 조성물에서 활성성분으로 사용되는 진세노사이드 Rg₅는 순수한 진세노사이드 Rg₅만을 분리하여 사용하거나, 또는 진세노사이드 Rg₅를 다량 함유하는 추출물로서 사용될 수도 있다. 진세노사이드 Rg

₅를 함유하는 추출물의 형태로 사용하는 경우에, 추출물중의 Rg₅의 함량은 10% 이상인 것이 바람직한데, 이는 Rg₅의 함량이 10% 미만인 경우에는 목적하는 항암효과를 충분히 얻기 위해서 너무 과량의 추출물을 사용하여야 하기 때문이다.

본 발명에 따르는 활성성분으로서 진세노사이드 Rg₅를 함유하는 조성물은 암세포의 성장을 강력히 억제하는 효과를 가지고 있어서, 항암제로서 유용하게 사용될 수 있다. 항암제로서 임상적으로 사용할 때에, 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 통상적인 담체와 함께 배합하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를들면 정제, 캡슐제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제, 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사시에 주사용증류수로 재조제하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 형태인 주사용 제제, 연고제, 크림제, 액제 등의 국소적용형 제제, 좌제 등의 다양한 제제로 제형화시킬 수 있다.

본 발명의 조성물에서 사용될 수 있는 담체는 약제학적 분야에서 통상적인 것으로, 예를들어 경구투여용 제제의 경우에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 있으며, 주사제의 경우에는 보존제, 무통화제, 가용화제, 안정화제 등이 있고, 국소투여용 제제의 경우에는 기제, 부형제, 운화제, 보존제 등이 있다. 이렇게 제조된 약제학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로, 예를들면 정맥내, 피하, 복강내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 또한 경구투여시에 약제가 위산에 분해되는 것을 방지하기 위하여 제산제를 병용하거나, 정제 등의 경구투여용 고형제제를 장용피로 피복된 제제로 제형화하여 투여할 수도 있다.

본 발명에 따르는 진세노사이드 Rg₅의 인체에 대한 투여량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 암의 종류 및 중증도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로는 성인에게 1 일에 10 내지 500mg, 바람직하게는 50 내지 100mg 의 양이 투여되도록 한다. 따라서, 본 발명의 조성물을 단위투여형으로 제조시에 각각의 단위투여형은 상기 언급된 유효용량 범위를 고려하여 진세노사이드 Rg

₅ 10 내지 500mg, 바람직하게는 50 내지 100mg 을 함유하도록 제형화시킬 수 있다. 이렇게 제형화된 단위투여형은 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나, 일정시간 간격으로 수회, 바람직하게는 1 내지 6 회 분할 투여할 수 있다.

본 발명에 따르는 조성물의 활성성분인 진세노사이드 Rg₅ 는 추출하는 실험결과로부터 입증되는 바와 같이 실험 동물에 대하여 급성독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있다.

본 발명은 이하의 실시예 및 실험예에 의해 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이들에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[실시예 1][진세노사이드 Rg₅ 를 함유하는 인삼추출물의 제조(I)]밀폐된 용기에 수삼 100g 을 넣고 130℃ 에서 2 시간 동안 가열처리하였다. 이 가공인삼을 메탄올 200ml 로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올을 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100ml 에 헥사키 에테르 100ml 씩으로 3 회 추출한 다음, 남은 수층을 수포화 부탄올 100ml 씩으로 3 회 추출하여 사포닌이 함유된 부탄올 추출액을 얻었다. 이 부탄올 추출물을 건조하여 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실리카겔 칼럼을 반복 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg

₅ 를 60% 함유하는 분획 약 500mg 을 수득하였다.

[실시예 2][진세노사이드 Rg₅ 를 함유하는 인삼추출물의 제조(II)]건조된 마삼 10kg 에 메탄올 20ℓ를 가하여 수 욕상에서 4 시간 동안 환류시켜 추출하고 여과하여 수득한 인삼추출물을 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시료상의 인삼추출물을 가압멸균기에 넣고 120℃ 에서 4 시간 동안 가열하였다. 가열처리된 인삼추출물을 실시예 1 에서와 동일한 방법으로 실리카겔 칼럼상에서 크로마토그래피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg

₅ 를 50% 함유하는 분획 약 10g을 수득하였다.

[실시예 3][진세노사이드 Rg₅ 를 함유하는 인삼추출물의 제조(III)]인삼 1kg 에 메탄올 2ℓ를 가하여 수욕상에서 4 시간 동안 환류추출하고 여과하여 수득한 인삼추출물을 감압하에서 건조시켰다. 수득한 시료상의 인삼추출물을 물/아세트산(1:1) 혼합용매 1ℓ에 녹이고 70℃ 에서 2 시간 동안 교반하였다. 이 산처리된 인삼추출물을 실시예 1 에서와 동일한 방법으로 실리카겔 칼럼상에서 크로마토그래피시켜 목적하는 진세노사이드 Rg

₅ 를 70% 함유하는 분획 약 1g 을 수득하였다.

[실시예 4][진세노사이드 Rg₅ 의 제법(IV)]인삼 1kg 을 메탄올 200ml 로 추출하여 메탄올 추출물을 얻고 메탄올을 증발시켜 제거한 후에 남은 잔사를 물 100ml 에 헥사키 에테르 100ml 씩으로 3회 추출한 다음, 남은 수층을 부탄올/에틸아세테이트(10:1) 혼합액 100ml 씩으로 3 회 추출하였다. 남은 수층을 수포화 부탄올 100ml 씩으로 3 회 추출하여 파낙사디올게 사포닌이 함유된 분획을 얻었다. 이 파낙사디올게 분획을 실시예 1 에서와 같은 방법으로 열처리하여 진세노사이드 Rg

₅ 가 주로 함유된 분획을 얻었다. 이 분획을 에틸아세테이트/메탄올/물(20:1:1)의 혼합용매를 용출제로 사용하여 실리카겔 칼럼을 반복 실시하여 목적하는 진세노사이드 Rg

₅ 를 함유하는 분획을 얻었다. 이 진세노사이드 Rg

₅ 의 분획을 메탄올, 에틸아세테이트 혼합용매로 재결정화시켜 목적하는 진세노사이드 Rg₅ 약 50mg 을 수득하였다.

[실험예 1][인체 간암세포에 대한 인삼사포닌 Rg₅ 의 세포성장억제효과]DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco 사 제품) 13.8g 을 탈이온수 1ℓ에 용해시킨 후, 탄산나트륨과 염산 용액을 사용하여 pH 를 7.4 로 조정한다. 다음, 10% 송아지 혈청, 1×10

⁻⁷M 인슐린 및 겐타마이신 50mg/ℓ를 가하여 밀리포어 여과기로 멸균하여 배양액을 제조하였다. 이 배양액에 각각 인체 간암세포주 sk-Hep-1, 간세포주 Chang liver, 흰쥐 간암세포주 FTO-2B, 원숭이 신장암 세포주 COS7, 인체 자궁암세포주 HeLa 등 T 플라스크의 면적 25cm² 당, 1×10

⁻⁶ 세포의 비율로 접종하여 탄산가스 5% 를 유지하는 37℃ 의 배양기내에서 48 시간 동안 배양하였다. 이 배양물을 24-웰(well) 배양용기에 옮겨 1 일 동안 계대배양한 후, 인삼사포닌 Rg

₅ 0.1 내지 50μm 씩으로 처리하였다. 대조군에는 인삼사포닌 Rg

₅ 대신에 용매인 50% 에탄올을 동량 처리하였다. 인삼사포닌 Rg

₅ 를 처리한지 12 시간 후에 ³H-표지된 티미딘을 1μCi/ml 의 농도가 되도록 처리하고 12 시간 경과후에 각웰로부터 배지를 제거하고 메탄올을 사용하여 세포를 고정시키고 PBS 로 세척하였다. 10% 트리클로로아세테이트로 2

회 세척하여 미반응 방사선 티미딘을 제거하였다. 세포를 1N 수산화나트륨으로 용해시키고 1N 염산으로 중화시킨 후, DNA 에 도입된 방사능을 섬광계수기(Pharmacia 1024)로 측정하였다. 그 결과를 다음 표 1 에 기재하였다.

[표1]

진세노사이드 Rg₅ 의 농도에 따른 각 암세포주에 대한 방사성 티미딘 도입량

농도(μ M)	대조군에 대한 백분율				
	sk-Hep-1	Chang liver	FTO-2B	COS7	HeLa
대 조 군	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	78.6	77.0	98.5	81.3	67.4
0.5	48.1	58.1	91.0	61.6	48.6
1	31.9	49.8	73.2	46.2	43.1
5	10.6	26.3	13.8	0.9	1.5
10	2.2	1.1	0.4	0.3	0.3
25	0.7	0.5	0.2	0	0.2

상기 표 1 에 기재된 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Rg 는 0.5 내지 1 μ m 농도에서 방사선 티미딘 도입량을 대조군에 비해 1/2 이하로 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, 진세노사이드 Rg

가 암세포의 성장을 현저히 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[실험예 2][인체 간암세포주에 대한 인삼사포닌 Rg 의 세포성장억제효과(MTT 실험)]DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco 사 제품) 13.8g 을 탈이온수 1ℓ에 용해시킨 후, 탄산나트륨과 염산 용액을 사용하여 pH 를 7.4 로 조정함 다음, 10% 송아지 혈청, 1×10

M 인슐린 및 겐타마이신 50mg/ℓ를 가하여 밀리포어 여과기로 멸균하여 배양액을 제조하였다. 이 배양액에 서울대학교 암연구소로부터 분양받은 인체 간암세포주 sk-Hep-1 를 T 플라스크의 면적 25cm² 당, 1×10

세포의 비율로 접종하여 탄산가스 5%를 유지하는 37℃ 의 배양기내에서 48 시간 동안 배양하였다. 이 배양물을 96-웰 배양용기에 각 웰당 10

세포의 농도로 옮겨 1 일 동안 계대배양한 후, 인삼사포닌 Rg 0.1 내지 50 μ m 씩으로 처리하였다. 인삼사포닌 Rg

를 처리한지 48 시간 후에 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 용액(5mg/ml) 50 μ ℓ 를 가하고 37℃에서 4 시간 동안 처리하여 불용성의 포르마잔을 생성시키고 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 100 μ ℓ 의 DMSO(디메틸설폭사이드)를 가해 형성된 포르마잔 침전을 용해시키고, 형성된 포르마잔의 양에 대한 지표로 570nm 에서의 흡광도를 자동평판 판독기(automatic plate reader)로 측정하였다. 그 결과는 다음 표 2 에 기재하였다.

[표2]

**인체 간암세포주 sk-Hep-1 에 대한 진세노사이드 Rg₅ 의 세포성장억제효과
(MTT 분석)**

농 도(μ M)	흡 광 도(O.D.) (평균±표준편차)	대조군에 대한 백분율
대 조 군	0.814 ± 0.034	100.0
0.1	0.784 ± 0.033	96.4
1	0.785 ± 0.037	96.5
5	0.593 ± 0.020	72.9
10	0.103 ± 0.013	12.6
25	0.053 ± 0.001	6.5
50	0.055 ± 0.003	6.7

상기 표 2 에 기재된 결과로 부터, 진세노사이드 Rg₅ 는 10 μ m 이상의 농도에서 강력한 암세포성장억제효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[실험예 3][세포단백질 추출액의 제조]서울대학교 암연구소로부터 분양받은 간암세포주 sk-Hep-1 을 1×10 세포의 농도로 10mm 배양용기에 깔고 DMEM 배지에서 24 시간 동안 배양한 후, 세포를 동조화(synchronization)시키기 위하여 1.5mM 하이드록시우레아로 14 시간 동안 처리하였다. 그후에 배양용기내의 배지를 인삼사포닌 Rg

-DMEM 배지(Rg 0.1 내지 25 μ m 로 처리한 배지)로 교환하여 다시 24 시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 Rg

를 용해시키는데 사용된 75% 에탄올을 배지 전체량의 0.05% 가 넘지 않도록 첨가하여 사용하였다. 배지를 제거하고 냉각된 PBS 로 2 회 세척한 후, 배양접시당 RIFA 완충액[1% 트리톤 X-100, 1% 나트륨데옥시클레이트, 0.1% SDS, 0.15% NaCl, 1mM 페닐메틸-설포닐클로라이드, 0.2mM EDTA, 50mM NaF, 0.2mM Na

Vo, 30mM β 글리세로포스페이트, 프로테아제 억제제(proteinase inhibitor) 100 μ l 를 사용하여 세포를 수집한 후에 12,000rpm 에서 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액을 이하의 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis) 및 면역복합체 키나제 분석(Immune complex kinase assay)시험에서 세포용해물로 사용하였다.

[실험예 4][cdk2, 사이클린 A, 사이클린 E 및 cdc25A 에 대한 웨스턴 블롯 분석]실험예 3 에서 수득된 세포용해물 20 μ g 을 4 배 SDS(나트륨도데실설페이트) 샘플 완충액(200mM 트리스, pH 6.8, 400mM DTT(디티오프레일), 8% SDS, 0.4% 브로모페놀블루, 20% 글리세롤)과 혼합시킨 후에 100℃ 에서 5 분 동안 변성시키고 12% SDS-폴리아크릴아미드 마니겔에서 전기영동하였다. 전이장치를 이용하여 단백질을 PVDF 막으로 이동시켰다. 단백질이 블롯팅된 PVDF(폴리비닐리덴플루오라이드) 막을 실온에서 완전히 건조시켜 5% 탈지분유 용액에서 1 시간 동안 배양한 후에 TBST(50mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.05% 트윈 20)로 1 분씩 3 회 세척하고, 일차항체로 cdk2 는 1:2,500, 사이클린 A 는 1:2,000, 사이클린 E 는 1:2,000, cdc25A 는 1:2,500 의 비로 TBST 로 희석하여 5ml 씩 가한 후 1 시간 동안 배양하였다. PVDF 막을 TBST 용액으로 5 분씩 3 회 세척하고 퍼옥시다제-결합된 이차항체(안티-토끼 Ig)를 TBST 용액으로 1:15,000 이 되도록 희석한 액으로 1 시간 동안 배양하였다. 다시 TBST 용액으로 5 분씩 4 회 세척하고 ECL(Enhanced Chemiluminescence) 면역블롯팅 키트(immunoblotting kit) (Amersham 사 제품)의 시약 1 과 2 를 동량 혼합한 액과 PVDF 막을 1 분 동안 반응시킨 다음 플라스틱 랩에 싸서 아그파(Agfa) X-선 필름으로 화학발광성을 측정하였다. 측정된 결과는 제1도에 나타내었다.

제1도에 도시된 결과에 따르면 인삼사포닌 Rg₅ 는 세포주기중의 G1/S 에서 작용하는 사이클린 E, cdk2, cdc25A 의 단백질 양을 감소시키고, 세포주기중의 S 주기에서 작용하는 사이클린 A 의 양에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 결과로 부터 인삼 사포닌 Rg

는 특이적으로 G1/S 세포주기에서만 작용하여 암세포의 성장을 억제하는 것을 알 수 있다.

[실험에 5][면역복합체 키나제 분석(immune complex kinase assay)] 실험에 3 에서와 같이 인삼사포닌 Rg 처리된 간암세포주 sk-Hep-1 로부터 분리된 세포용해물 100 μ g 을 BSA(bovine serum albumin) 전피복된-세파로즈를 사용하여 예비 정제한 후에 상등액에 사이클린 E 항체를 샘플당 1 μ l 씩의 양으로 가하여 배양하였다. 이 면역침전물을 단백질 A 비드(bead)를 가하여 침전시키고 RIPA 완충액으로 3 회, 2 배 H1 키나제 분석 완충액(100mM 트리스, pH 7.6, 20mM MgCl

, 2mM DTT, 1 μ g/ml 안티페인, 로이팍틴, 펨스티틴)으로 3 회 세척하였다. 이 면역침전물의 H1 키나제 분석은 0.6mg/ml 의 히스톤 H1 을 포함하는 완충액(50 μ M ATP, 10 μ Ci[

γ -³²P]ATP)를 가한 후에 30℃ 에서 30 분 동안 반응시키고 히스톤 H1 의 인산화를 12% SDS-PAGE 한 후에 자기 방사기록법(autoradiography)에 의해 측정함으로써 행하였다. 측정결과는 제2a도에 나타내었다. 또한 측정된 결과를 densitometer(UC 630, Umax)와 이미지퀀트(ImageQuant) 프로그램(Molecular Dynamics)에 의해 정량하여 제2b도에 나타내었다.

제2도에서 보는 바와 같이 진세노사이드 Rg₅ 는 사이클린 E 와 cdk2 의 양을 감소시켜 cdk2 키나제의 활성을 억제함으로써 항암효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[실험에 6][진세노사이드 Rg₅ 의 급성독성 실험] 체중 20 내지 40g 의 마우스 40 마리를 실험동물로 사용하여 본 발명에 따르는 진세노사이드 Rg₅ 투여군과 대조군의 총 2 개의 군으로 나누어 각군에 20 마리씩의 실험동물을 사용하였다. Rg

₅ 투여군의 마우스에는 실시예 4 에서 순수하게 분리하여 수득한 진세노사이드 Rg₅ 를 생리식염수 1ml 에 현탁시켜 경구투여하고, 투여 14 일 후에 생존동물수를 관찰하였다. 대조군에는 생리식염수 1ml 만을 경구투여하였다. 측정된 결과는 다음 표 3 에 나타내었다.

[표3]

상기 표 3 에 기재된 결과로 부터, 본 발명에 따르는 진세노사이드 Rg 는 실질적으로 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

[조성물에][조성에 1]

옥수수전분	44g
결정성 셀룰로오즈	40g
카복시메틸셀룰로오즈칼슘	5g
마그네슘스테아레이트	1g
실시예 1 에서 수득한 Rg ₅ -함유 분획	10g

제 100g

상기한 처방에 따라 각 성분을 균일하게 혼합한 다음 타정기에서 압축성형하여 1 정당 중량이 500mg 인 정제를 제조하였다. 이 정제 1 정에는 실시예 1에서 수득한 Rg

5-함유 분획 50mg 이 함유되어 있다. 성인은 1 일 3 내지 10 정을 수회에 나누어 복용할 수 있다.

[조성예 2]

상기한 처방에 따라 결정성 셀룰로오즈, 10% 하이드록시프로필셀룰로오즈 에탄올 용액 및 실시예 2 에서 수득한 분획을 균일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 건조시키고 분쇄한 후 카복시메틸셀룰로오즈 칼슘, 마그네슘스테아레이트를 혼합하여 타정기에서 압축성형하여 1 정 중량이 500mg 인 정제를 제조하였다. 이 정제 1 정에는 실시예 2 에서 수득한 Rg

5-함유 분획 50mg 이 함유되어 있다. 성인은 1 일 3 내지 10 정을 수회에 나누어 복용할 수 있다.

[조성에 3]

주사용 증류수	86.5g
에탄올	5g
대두인지질	2.5g
글리세린	5g
실시에 3 에서 수득한 Rg ₅ -함유 분획	1g
<hr/>	
계	100g

상기한 처방에 따라 실시에 3 에서 수득한 Rg₅-함유 분획을 에탄올 및 대두인지질에 용해시키고, 여기에 주사용 증류수와 글리세린의 용액을 가하여 유화시켜 주사제를 제조하였다.

[조성에 4]

상기한 처방에 따라 ㉠ 내지 ㉡ 을 성분 ㉢ 에 용해시켜 액제를 제조하였다. 이 액제 100ml 는 실시예 1 에서 얻은 Rg

5-함유 분획 200mg 을 함유한다.

[조성예 5]

결정성 셀룰로오스	440g
-----------	------

마그네슘스테아레이트	10g
------------	-----

실시예 4 에서 수득한 Rgs	50g
------------------	-----

계 500g

상기한 처방에 따라 각 성분을 균일하게 혼합하여 통상의 방법에 따라 조립기를 이용하여 조립하고 충전기에서 충전하여 캡셀당 500mg 의 캡셀제를 제조하였다. 이 캡셀제 1 캡셀에는 Rg

5 50mg 이 함유되어 있다. 성인은 1 일 3 내지 10 캡셀을 수회에 나누어 복용할 수 있다.

(57)청구의 범위

청구항1

활성성분으로서 진세노사이드 Rg₅ 를 함유하는 항암제 조성물.

청구항2

활성성분으로서 진세노사이드 Rg₅ 를 10% 이상 함유하는 인삼 추출물을 함유하는 항암제 조성물.

청구항3

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 단위투여형으로 제형화됨을 특징으로 하는 항암제 조성물.

청구항4

제3항에 있어서, 단위투여형 약제학적 제형이 정제, 경질 또는 연질캡셀제, 과립제, 액제, 현탁제, 주사용 용액 또는 현탁액임을 특징으로 하는 항암제 조성물.

청구항5

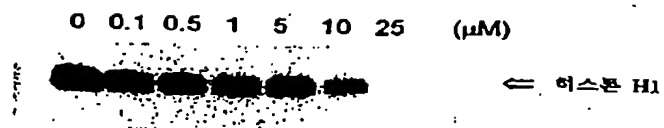
제4항에 있어서, 단위투여형이 진세노사이드 Rg₅ 10 내지 500mg 을 함유하도록 제형화됨을 특징으로 하는 항암제 조성물.

도면

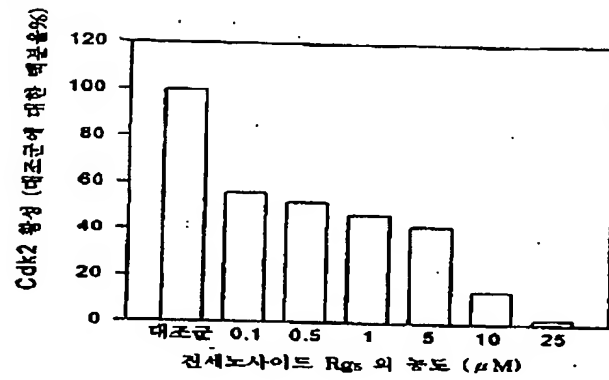
도면1

도면2

A.



B.



(2) KR 0183448 (CHEIL JEDANG Co. et al.)

Abstract

The present invention relates to a composition having an anticancer activity comprising Rg5, one of ginseng components, as an active ingredient. The Rg5 of the present invention is hardly present in ginseng plants such as fresh ginseng and white ginseng but only a trace amount is present in red ginseng. Its content in ginseng plants is drastically increased when ginseng plants are heated at 110 - 180 °C for 0.5-20 hrs. It has a strong anticancer activity, in particular, against liver cancer cells.

Claims

1. An anticancer composition comprising Rg5 as an active ingredient.
2. An anticancer composition containing a ginseng extract which comprises more than 10% of Rg5 as an active ingredient.
3. The anticancer composition according to claim 1, wherein said anticancer composition is formulated in the form of a unit dosage along with a pharmaceutically acceptable carrier.
4. The anticancer composition according to claim 3, wherein said pharmaceutical formulation in the form of a unit dosage is in tablets, soft or hard capsules, granules, liquids, suspensions, injections or suspension liquids.
5. The anticancer composition according to claim 4, wherein said unit dosage is formulated to contain Rg5 in the amount of 10 to 500 mg.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.